

Posudek školitele diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče/ky: Bc. Katarína PŠENÁKOVÁ

Název práce: Structural study of the ASK1:Thioredoxin complex

Hodnocení jednotlivých aspektů práce (ve standardní stupnici 1 až 4)

1. Samostatnost uchazeče/ky

Ve fázi zpřesňování tématu práce	1
Během zpracování zadaného tématu	1
Při sepisování práce	1

2. Komunikativnost, schopnost spolupráce

1

3. Zájem o práci a pracovní nasazení uchazeče/ky

1

Případný slovní komentář k bodům 1. až 3. :

V první části své diplomové práce se Katarína Pšenáková zabývala přípravou a biofyzikální charakterizací thioredoxin vazebné domény proteinkinasy ASK1 (ASK1-TBD, sekvence 88-302) a jejího komplexu s thioredoxinem (TRX). TRX je bílkovina, která reguluje funkci ASK1 kinyasy a detaily její interakce s příslušnou vazebnou doménou ASK1 jsou neznámé. Spektra cirkulárního dichroismu v oblasti dalekého-UV umožnila odhadnout obsah sekundární struktury ASK1-TBD a zároveň ukázala, že tvorba komplexu neovlivňuje strukturu ASK1-TBD na úrovni sekundární struktury. CD spektra v oblasti blízkého-UV naznačila, že tvorba komplexu ovlivňuje strukturu či okolí jediného tryptofanového zbytku a to Trp31 v aktivním centru TRX. Dalším úkolem této práce bylo připravit vzorky ASK1-TBD a jejího komplexu s TRX pro měření malouhlového rozptylu rentgenového záření (SAXS). Katarína Pšenáková tyto vzorky úspěšně připravila a SAXS experimenty potvrdily, že ASK1-TBD a TRX tvoří stabilní komplex s molární stechiometrií 1:1. Naměřená data nám následně umožnily získat informaci o celkovém tvaru molekul ASK1-TBD jejího komplexu s TRX.

V druhé části své diplomové práce se Katarína Pšenáková věnovala optimalizaci expresního konstruktů ASK1-TBD vhodného pro rentgenostrukturní analýzu. Otestovala expresi a purifikaci sedmi různých konstruktů. Na základě těchto experimentů vybrala ten s nejlepší rozpustností a stabilitou a u tohoto konstruktů následně zkontrolovala jeho interakci s TRX pomocí nativní elektroforézy a jeho monodisperzitu pomocí DLS. Tento konstrukt bude dále použit pro hledání krystalizačních podmínek.

Katarína Pšenáková se v průběhu řešení DP seznámila s metodami exprese a purifikace rekombinantních bílkovin, DLS, SAXS a CD spektroskopie. Pracovala pečlivě, samostatně a o zadané téma jevila velký zájem. Rád bych ocenil zejména její velkou pracovitost a mimořádné osobní nasazení.

Stanovisko k opravě chyb v práci:

opravný lístek/oprava v textu **NENÍ** podmínkou přijetí práce

C. Celkový návrh

Práci doporučuji k přijetí k dalšímu řízení: **ANO**

Navrhovaná celková klasifikace: 1

Datum vypracování posudku: 12. 5. 2015

Jméno a příjmení, podpis školitele: prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.